



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	エストラジオールは嘔吐中枢における TACR1 遺伝子の発現を増大させ、術後悪心嘔吐における性差に関与する 1 TACR1 gene polymorphism is associated with gender differences in postoperative nausea and vomiting 2 Estradiol enhances female pica behavior through TACR1 expression in the caudate putamen (1 T A C R 1 遺伝子は術後悪心嘔吐における性差に関与する 2 エストラジオールは雌マウスにおいて TACR1 遺伝子を尾状被殻において発現させ、パイカ行動を増強する)
Author(s) 著 者	早瀬, 知
Degree number 学位記番号	甲第 2779 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

# 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2779 号	氏 名	早瀬 知
<p>論文題名</p> <p>エストロジオールは嘔吐中枢における TACR1 遺伝子の発現を増大させ、術後悪心嘔吐における性差に関与する</p> <p>主論文 1</p> <p>TACR1 遺伝子変異は術後悪心嘔吐における性差に関与する</p> <p>研究目的</p> <p>術後悪心嘔吐（PONV）は 20~30%の患者に発症する、全身麻酔後に起こる最も頻度の高い合併症である。近年のメタ解析では女性であることが最も高リスクであることが指摘された。ニューロキニン 1（NK1）受容体は脳内の嘔吐中枢に広く分布し、悪心嘔吐との関連が指摘されている。化学療法領域において、制吐剤として高い効果を認められている NK1 受容体拮抗薬は、海外の臨床研究において PONV に予防効果が認められている一方で、女性において男性よりも有効性が高い可能性が指摘されている。私は本研究において NK1 受容体をコードする遺伝子である TACR1 遺伝子の一塩基多型（SNP）は PONV の発症に関与し、かつ性差の機序を説明しうる可能性があると考えた。本研究の目的は TACR1 遺伝子の SNP と PONV との関連について検討し、女性において PONV の発症頻度が高い機序を予測することである。</p> <p>研究方法</p> <p>[麻酔方法および術後悪心嘔吐の評価]</p> <p>札幌医科大学附属病院において全身麻酔下にて下腹部手術を受ける婦人科患者 150 名、泌尿器科患者 50 名を対象とした。麻酔法は硬膜外麻酔併用全身麻酔で行った。術前に第 11・12 胸椎間にカテーテルを留置し手術終了後、硬膜外カテーテルよりフェンタニル（2 <math>\mu\text{L mL}^{-1}</math>）添加 0.2%ロピバカイン 4 <math>\text{mL h}^{-1}</math>を持続注入した。PONV の強度は術後 6・24・72 時間時点で 0~100 ビジュアルアナログスケール（VAS）で評価した。VAS 75 以上を術後 72 時間以内に記録した場合、重度 PONV を発症したと定義した。</p> <p>[遺伝子型の決定]</p> <p>手術開始前に患者全血 2 mL を採血し gDNA を抽出した。TACR1 遺伝子およびその近傍より Haploview（ver 4.1）ソフトウェアにより 27 SNPs を選択し、サンガーシークエンス法により遺伝子型を決定した。</p>			

#### [データ解析]

27 SNPs に対して転写因子解析ソフトウェアにより転写因子結合部位を予測した。また 27 SNPs について DNase I 高感受部位との位置関係を照合した。遺伝子型の相は fastPHASE ソフトウェアにより解析し、ハプロタイプの頻度順に H1 から H4 までの 4 群およびその他として定義した。性別・年齢・体重・慎重・手術時間および重度 PONV の発症について関連する傾向のある SNPs および各ハプロタイプについて単変量解析を行い、単変量解析によって関連の示唆された患者背景因子およびハプロタイプについて多変量解析を行った。統計解析には SPSS (ver 21.0) を用い、P 値は 5%未満を有意とした。

#### 研究成績

嘔気 VAS は術後 6 時間で 24 時間、72 時間と比較して有意に高かった。重度 PONV は女性 55 名、男性 2 名に発症した。本研究において選択した 27 SNPs のうち 2 つの SNPs (rs3821313、rs3755468)において、変異型の遺伝子をもつ患者において有意に嘔気 VAS は低下し、重度 PONV の発症頻度も減少した。さらに 2 つの SNPs(rs3771836、rs1447156)において有意差はなかったものの、変異型の遺伝子をもつ患者で重度 PONV の発症頻度が増大する傾向を認めた (それぞれ  $P = 0.07, 0.09$ )。これら 4 つの SNPs により構成されるハプロタイプを解析した結果、H1 ハプロタイプをもつ患者がその他の患者と比較して有意に嘔気 VAS および重度 PONV の発症頻度が低減した。多変量解析により、①H1 ハプロタイプをもたないことおよび②女性、が独立した PONV の危険因子として推測された (それぞれのオッズ比 3.7、10.5)。転写因子解析では、rs3755468 はエストロゲン応答配列上に存在し、DNase I 高感受部位と一致した。

#### 考察

Haploview ソフトウェアによって選択された 27SNPs のうち 4 つの SNPs (rs3821313、rs3771836、rs3755468、rs1477156) が重度 PONV の発症と関連する傾向が示唆された。4 つの SNPs は全て intron 領域に存在した。intron 上に存在する SNP が受容体の機能に影響を与える機序の一因として、遺伝子上に存在する全ての SNPs は連鎖平衡の関係にあり、exon 上にある SNPs と連鎖して変異することにより、受容体の機能に影響を与えている可能性がある。例えば、rs1477156 は exon 上に存在する rs6715729 と強い連鎖平衡定数を持ち、rs1477156 は NK1 受容体のアミノ酸構造を変化させている可能性が示唆される。しかし他の SNPs に関しては今回の結果からは exon 上の SNPs と強い連鎖平衡状態に存在するものは認められなかった。intron 上の存在する SNPs が受容体の機能を修飾する別の可能性として、SNP が遺伝子の cis 調節配列内に存在する場合、SNP が遺伝子の転写に影響を及ぼす可能性がある。また特定のハプロタイプは PONV の強度と発症頻度を低減させる可能性が示唆された。転写因子の解析結果では、rs3755468 はエストロゲン応答配列の一部で、かつ DNase I 高感受部位と一致した。これらの結果から、TACR1 遺伝

子はエストロゲンによってその発現が調節され、その結果エストロゲンの基礎分泌量の高い女性において TACR1 遺伝子の DNase I 高感受部位であり、かつエストロゲン応答配列上に存在する SNP による臨床症状の差が認められる可能性が示唆された。

## 主論文 2

エストラジオールは雌マウスにおいて TACR1 遺伝子を尾状被殻において発現させ、パイカ行動を増強する

## 研究目的

先の研究においてエストロゲンが TACR1 遺伝子の発現を調節し、PONV の性差の機序の一つではないかと推測された。ヒトにおける fMRI の知見から、近年悪心嘔吐の発症メカニズムの一つとして被殻と扁桃体において悪心嘔吐は知覚され、古典的な嘔吐中枢と考えられている最後野や孤束核において悪心嘔吐が強化されると示唆された。とくに被殻においては、NK1 受容体の発現量および NK1 受容体のリガンドであるサブスタンス P の結合能に明らかな性差が認められている。本研究の目的は被殻・最後野・孤束核における TACR1-mRNA の発現量および NK1 受容体の発現量がエストロゲンによって増強するか検討することである。

## 方法

### [マウス PONV モデルの作製]

はじめにマウスにおける PONV モデルを作製するため、吸入麻酔薬およびげっ歯類において嘔気を誘発する薬剤として知られるモルヒネを用い性差を確認した。以下全ての実験には生後 7~9 週、体重 20~25 g の C57BL6 マウスを使用した。以下の 3 群につき、雌雄各 8 匹を用いて検討した。naïve 群: control 群、Sev 群: 100%酸素および 5%セボフルランを 1 時間吸入させた。M 群: 塩酸モルヒネ 20 mg/kg を腹腔内投与した。処置開始より 24 時間後にマウスにおける悪心嘔吐の間接的な指標として知られるパイカ行動（食餌以外の物質を食べる異食行動）を観察するため、無味であるカオリンペレットの摂取量を測定した。

### [雌マウスにおけるエストラジオールのパイカ行動に対する影響]

雌マウス（各群 n=8）について以下の 4 群を設定した。naïve 群: control 群、Vehicle 群: 100% 酸素および 5%セボフルランを 1 時間吸入後、塩酸モルヒネ 20 mg/kg を腹腔内投与した。E<sub>2</sub> 群: 100%酸素および 5%セボフルランを 1 時間吸入後、塩酸モルヒネ 20 mg/kg およびエストラジオール 1 µg/body を腹腔内投与した。E<sub>2</sub>+ICI 群: 100%酸素および 5%セボフルランを 1 時間吸入後、塩酸モルヒネ 20 mg/kg、エストラジオール 1 µg/body およびエストロゲンのアンタゴニストである ICI182,780 を 20 mg/kg を腹腔内投与した。先の実験と同様にカオリンペレットの摂取量を測定した。

### [最後野・孤束核・被殻における TACR1 遺伝子の mRNA 発現量の測定]

雌マウスを上述した 4 群に割り付けた (naïve 群、Vehicle 群、E<sub>2</sub> 群および E<sub>2</sub>+ICI 群；各群 n=8)。セボフルラン投与終了後 2 時間経過した時点で断頭し、最後野・孤束核および被殻を含む 10 μm のスライスをそれぞれ作製した。Alexa488-conjugated NeuN 抗体でニューロンを染色し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによりニューロンを単離した。得られたニューロンから total RNA を抽出し、TACR1 遺伝子に特異的な TaqMan プローブを用いて qRT-PCR により TACR1-mRNA 発現量を定量した。

#### [被殻における NK1 受容体タンパク発現量の測定]

雌マウスを同様に naïve 群、Vehicle 群、E<sub>2</sub> 群、E<sub>2</sub>+ICI 群に割り付けた (各群 n=8)。naïve 群は任意の時点で、その他の群についてはセボフルラン投与終了後 2 時間経過した時点で断頭し被殻を含むブロックを抽出し、ウサギ抗 NK1 受容体抗体に反応させた。その後 TaqMan Protein Assay Open Kit を用いて NK1 受容体タンパク発現量を定量した。統計解析には SPSS (ver 21.0) を用い、P 値は 5%未満を有意とした。

#### 研究成績

雌マウスにおいてモルヒネによるカオリン摂取量の増大を認めたが、雄マウスではモルヒネ投与後もカオリン摂取量の増加を認めなかった。TACR1-mRNA の発現量について、最後野・孤束核においてセボフルラン投与終了後 2 時間経過した時点での TACR1-mRNA の発現量は群間差を認めなかった。被殻においては E<sub>2</sub> 群で naïve 群および E<sub>2</sub>+ICI 群と比較して有意に TACR1-mRNA の発現量の約 6 倍の増大を認めた。NK1 受容体タンパクの発現量は、E<sub>2</sub> 群で naïve 群および E<sub>2</sub>+ICI 群と比較して NK1 受容体タンパクの発現量は約 1.5 倍に増大した。

#### 考察

エストラジオールを投与したモデルにおいてパイカ行動が増強したため、エストラジオールはモルヒネ存在下に悪心嘔吐を増強する可能性が示唆された。TACR1-mRNA および NK1 受容体タンパクの発現量の増大はエストラジオール投与された群の被殻においてのみ増大を認めた。被殻は悪心嘔吐を知覚する神経核であるため、被殻における NK1 受容体の発現量の増大は早期 PONV 発症の機序の一つであると推測された。

#### 結論

エストラジオールはマウスでは被殻における NK1 受容体の発現量を増大させ、術後早期悪心嘔吐の発症の機序の一つである可能性が示唆された。またヒトにおいて NK1 受容体をコードする遺伝子である TACR1 遺伝子のエストロゲン応答配列上に存在する一塩基多型は、術後悪心嘔吐の強度・頻度を変化させる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨及び担当者

平成 26 年 2 月 13 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2779 号	氏 名	早瀬 知
論文審査 担 当 者	主査 山蔭 道明	副査 齋藤 豪	
	委員 舩森 直哉	委員 鈴木 拓	

論文題名	<p>エストラジオールは嘔吐中枢における TACR1 遺伝子の発現を増大させ、術後悪心嘔吐における性差に関与する</p> <p>1 TACR1 gene polymorphism is associated with gender differences in postoperative nausea and vomiting (T A C R 1 遺伝子は術後悪心嘔吐における性差に関与する)</p> <p>2 Estradiol enhances female pica behavior through TACR1 expression in the caudate putamen (エストラジオールは雌マウスにおいて TACR1 遺伝子を尾状被殻において発現させ、パイカ行動を増強する)</p>
<p>結果の要旨</p> <p>ニューロキニン 1(NK1)受容体をコードする遺伝子である TACR1 遺伝子の一塩基多型(SNP)と PONV の発症率を検討することにより、NK1 受容体を介する術後悪心嘔吐(PONV)の性差の機序を検討した。TACR1 遺伝子内に存在する rs3755468-SNP は PONV の発症頻度に関連し、エストロゲン応答配列内に存在し、かつ DNase I hypersensitivity site 内に存在することが予測された。この結果を検証するため、マウス術後悪心嘔吐モデルを用いて悪心嘔吐の代替行動であるパイカ行動を観察した。その結果エストラジオールおよびモルヒネはパイカ行動を増強し、エストラジオール拮抗薬である ICI182,780 は抑制した。さらに嘔吐中枢の一つと考えられる被殻においてモルヒネおよびエストラジオールは TACR1-mRNA および NK1 受容体の発現を増強し、ICI182,780 は抑制した。本研究はエストラジオールの曝露が被殻における NK1 受容体の発現を調節し、PONV の性差に関与する可能性を科学的に示したもので、医学博士授与に値する研究成果であるとの評価を審査委員全員から頂いた。</p>	